

Aus der I. Inneren Abteilung des Städtischen
Krankenhauses Berlin - Neukölln
(Ärztlicher Direktor: Prof.Dr.med.K.Holldack)

und

aus dem Institut für Hämatologie der GSF,
Assoziation mit EURATOM München
(Leiter: Prof. Dr. W. Stich)

Die Einwirkung von Daunomycin
auf menschliches Knochenmark in vitro.

Dissertation

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Zahnarzt Wolfgang Welt
aus Stuttgart

1973

Aus der I. Inneren Abteilung des Städtischen
Krankenhauses Berlin - Neukölln
(Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. K. Holldack).

und

aus dem Institut für Hämatologie der GSF,
Assoziation mit EURATOM München
(Leiter: Prof. Dr. W. Stich)

Die Einwirkung von Daunomycin
auf menschliches Knochenmark in vitro.

Dissertation

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Zahnarzt Wolfgang Welt
aus Stuttgart

Referent : Prof. Dr.med. I. B o l l
1. Korreferent : Prof. Dr.med. Dr.med.dent. R. H a r n d t
2. Korreferent : Prof. Dr.med.dent. K. E i c h n e r



Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Zahn-, Mund-
und Kieferheilkunde der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 22. Januar 1975

Meiner Mutter gewidmet



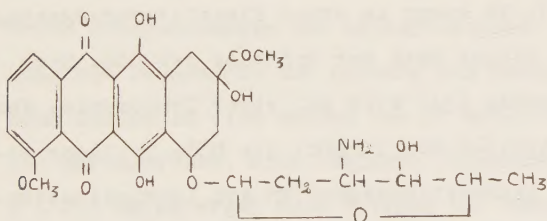
Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. <u>Einführung</u>	1
II. <u>Fragestellung</u>	8
III. <u>Methode</u>	9
IV. <u>Ergebnisse</u>	15
V. <u>Diskussion</u>	55
VI. <u>Zusammenfassung</u>	60
VII. <u>Literaturverzeichnis</u>	61

EINFÜHRUNG

Aus Kulturen der *Streptomyces peucetius* gelang es Grein (21) 1963 ein zur Gruppe der Tetracycline gehörendes Antibiotikum zu isolieren. Daunomycin^R, auf Grund seiner toxischen Wirkung auch Daunoblastin^R genannt, besteht aus einem intensiv rot pigmentierten Aglykon (daunomycinon) in glykosidischer Verbindung mit einem Aminosucker (daunosamin). Zur gleichen Zeit wurde es von Dubost (19) auf Grund seiner Farbe als Rubidomycin^R beschrieben. Die Strukturformel wurde 1964 von Arcamone und Mitarbeiter (1,5) veröffentlicht.



Die antibiotische Wirkung (36,38) beruht in einer wachstumshemmenden Wirkung auf gram-negative Mikroorganismen sowie Coliphagen.

Die cytotoxische und antimitotische Wirkung des Daunomycins beruht auf einer Hemmung der Desoxyribonukleinsäure (DNS) - und der DNS - abhängigen Ribonukleinsäure (RNS)- Synthese durch Einschaltung der DNS (15,16,29,30,36, 43,45). In vitro bildet Daunomycin mit der DNS Komplexe auf eine höchst spezifische Art (24,27,28,44). Nach Callendi (10) bindet sich Daunomycin an beide Stränge der DNS - Helix. Vermutlich kann der Aminozucker des Daunomycins in die RNS - Synthese eingreifen. Bei der Untersuchung der Wirkung auf Lymphozyten in vitro zeigte sich die hemmende Wirkung auf die DNS- und RNS- Synthese und eine Beeinflussung des Zellzyklus in der G_2 - Periode (45). Es kommt zu einer Eintrittsverzögerung der Mitose nach der Synthese der DNS. Nach Nekamura (34) wird bei einer Daunomycin- Konzentration von $1\mu\text{g/ml}$ die DNS- Synthese einer Leukozytensuspension von Leukämiepatienten um 30 % herabgesetzt. Die RNS- Synthese wird vergleichbar gehemmt, während bei einer Konzentration von $5\mu\text{g/ml}$ die DNS- Synthese stärker als die RNS- Synthese gehemmt wird.

Di Marco (16,31) hat die unterschiedliche Wirkung von Daunomycin, seinem N- Acetylderivat, und von Actinomycin D auf HeLa-Zellen in vitro verglichen. Hierbei konnte festgestellt werden, daß Daunomycin die nukleoläre, aber nicht die extranukleoläre RNS- Synthese hemmt, während N- Acetyl-Daunomycin die RNS- Synthese, aber nicht die Mitose, hemmt, und Actinomycin D die Gesamtproduktion von RNS hemmt.

Costa und Astaldi (25) untersuchten die Regenerationsintensität von Lymphozyten in vitro mit Hilfe des stathmokineticischen Testes (2) unter steigendem Daunomycinzusatz. Ein exponentieller Abfall des stathmokineticischen Indexes wurde festgestellt.

Erste Untersuchungen der antimitotischen Wirkung von Daunomycin auf normale und neoplastische Zellen in vivo wurden von Di Marco (11,13, 14) durchgeführt. Eine tägliche Injektion von 2 - 2,5 mg/kg ergab nach 8 Tagen bei Mäusen und Ratten eine Knochenmarkdepression, Größenabnahme der Milz, des Thymus und der Lymphknoten sowie eine 10 %ige Sterblichkeit (17). Das Wachstum transplanterter Tumoren auf

Mäuse und Ratten wurde nach Daunomycin- Injektion gehemmt (17,18,47). Wüst (46) maß in einem in-vitro-Testmodell die Wirkung von Daunomycin auf die Inkorporation von ^3H - Thymidin in frischen Tumorschnitten mit einem Liquid-Scintillations-Spectrometer. Es zeigte sich, daß tierische Tumoren eine geringere Empfindlichkeit gegen Daunomycin besitzen als menschliche. Die Antitumor - Wirkung bei Tieren und die biochemischen spezifischen Eigenschaften ließen es aussichtsreich erscheinen, die therapeutische Wirkung von Daunomycin gegen die neoplastische Krankheit beim Menschen zu prüfen. Erste klinische Untersuchungen (12,22,23,33,39,40,41,42) mit Daunomycin waren vor allem wirksam bei:

- a. der akuten Lymphoblastenleukämie
- b. der Paramyeloblastenleukämie
- c. dem Neuroblastom
- d. dem Rhabdomyosarkom

Nach Gerhartz (22,23) wurde bei isolierter Anwendung von Daunomycin bei Kindern eine vollständige Remission von 60 % und bei Erwachsenen von 50 % erreicht, wobei Daunomycin die beste

Wirkung gegen die Lymphoblastenleukämie erreichte. Die Dosis betrug 1 mg/kg 4 - 5 Tage lang. Mit einer täglichen Dosis bis 2 mg/kg über 5 - 6 Tage gegeben erzielte Bernard (3) bei der akuten lymphoblastischen Leukämie 58 % völlige Remissionen, bei der myeloblastischen Leukämie 64 %.

Mit solch hoher Dosierung ist die sicher wirksame Grenze aber schon erreicht, wenn nicht überschritten. Die Blutleukozytenwerte (38) reagieren mit einem sofortigen Abfall unter $2000/\text{mm}^3$ bei einer Dosis von 1,2 mg/kg. Dagegen halten sich die Leukozyten fast durchweg über $2000/\text{mm}^3$, wenn nur 1,0 mg/kg gegeben worden ist. Die häufig auf Grund der Markplasie auftretenden septischen Komplikationen werden von Bernard durch Aufenthalt des Patienten in keimfreien Räumen eingeschränkt. Bei 45 Kindern mit akuter Leukämie zeigten die Knochenmarksbilder nach Daunomycinbehandlung (41,42):

- 32 eine verringerte Zellzahl
- 16 eine Zunahme der erythropoetischen Zellen auf 69 %
- 24 eine Erhöhung der Reticulozyten

19 eine milde bis mäßige Megaloblastose. Als erstes Zeichen primärer Toxizität wird eine Knochenmarkhypoplasie festgestellt. Hierbei fällt die Leukozytenzahl schneller als die Thrombozytenzahl.

Bernard berichtete 1966 über das Auftreten von Megaloblasten, Riesennormoblasten, Megalocyten, Riesenmyeloblasten, Myelocyten und Metamyelocyten bis zur Ausbildung von Riesenzellen wechselnder Größe und Kern - Plasma - Relation.

Noch Tage nach einer Injektion sieht man im Knochenmark Paramyeloblasten, die jedoch Zeichen der Schädigung aufzeigen. Die Chromatinstruktur der noch erhaltenen Zellen ist meist verwaschen, zum Teil aber auch vergrößert, wodurch eine gekörnte Kernstruktur entsteht. Der Kernumriß kann sich unregelmäßig oder mehrbuchtig darstellen.

Die Kern - Plasma - Relation hat sich zugunsten des Plasmas verschoben. Im Plasma finden sich zahlreiche Kerne ohne Flasma.

Daunomycin ist auf keinen Fall ein harmloses antileukämisches Medikament. Außer einer

Idiosynkrasie können toxische Nebenwirkungen an verschiedenen Organen auftreten. Die kardi-ale Toxizität äußert sich in einer Myocardde-generation. Weitere Nebenwirkungen (26,32) sind Fieber, zum Teil verbunden mit fleckig-papulösen Hauterscheinungen, Haarausfall, Übelkeit und Erbrechen. Vereinzelt treten Ulzerationen der Mundschleimhaut auf.

FRAGESTELLUNG

Die Einwirkung von Daunomycin auf leukämische Zellen der Granulopoese des Knochenmarks und auf Tumoren wurden tierexperimentell und therapeutisch beim Menschen untersucht. Diese Untersuchungen erlauben keine exakte Aussage über die direkte Wirkung von Daunomycin an den menschlichen Knochenmarkzellen. Deswegen soll in dieser Arbeit der Effekt von Daunomycin in unterschiedlicher Konzentration, ohne Beeinflussung durch nervale und humorale Faktoren, auf normales menschliches Knochenmark untersucht werden.

Die Reifung und Regeneration der Knochenmarkzellen werden an Hand von Reifungskurven, Mitoseindices und karyologischen Kurven im Vergleich mit Kulturen ohne Zusatz beurteilt. Die Dosierung wurde an die aus der Literatur angegebenen therapeutischen Dosierung von 1 mg/kg angelehnt. Unseren Kulturen wurden Zusätze der Konzentrationen 1 δ /ml Daunomycin, 5 δ /ml Daunomycin und 10 δ /ml Daunomycin dem Koagulum + Serumtröpfchen beigelegt.

METHODE

Als Material standen Knochenmarkpunktate von fünf Patienten zur Verfügung. Die Kultivierung der Knochenmarkpunktate erfolgte nach der von Boll beschriebenen Deckglasmethode (5). Diese kurzfristige Kultivierung ist eine Modifikation der Carrel'schen Technik, der Gewebezüchtung im hängenden Tropfen.

Auf handelsübliche Deckgläser werden Tropfen aus 40 % autologem Nativplasma, 50 % Hank'scher Lösung und 10 % Corhormon^R 3-fach verstärkt gebracht. Es bildet sich ein Koagulum. Von dem Sternalpunktat wird ein Knochenmarkbröckel auf den koagulierten Tropfen gesetzt. Um das Austrocknen der Zellen zu verhindern, wird ein Tropfen Serum zugesetzt und die Kultur mit einem Hohlschliffträger und Paraffin luftdicht verschlossen. Sie wird bei 37° Celsius im Brutschrank inkubiert.

Das Ansetzen der Kultur erfolgt unter handsterilen Kautelen.

Von jedem Sternalpunktat wird ein Originalausstrich, eine Kontrollkultur und Kulturen mit

verschiedenen Zusätzen angefertigt.

1. Kontrollkultur ohne Zusatz
2. Kulturen mit 0,1 γ /ml Daunomycin
3. Kulturen mit 0,5 γ /ml Daunomycin
4. Kulturen mit 1,0 γ /ml Daunomycin
im Koagulum + Serumtröpfchen.

Nach einer Bebrütungsdauer von 24, 48 und 72 Stunden werden Ausstriche angefertigt, luftgetrocknet und nach Pappenheim panoptisch gefärbt.

Von jedem Präparat werden 1000 bis 2000 Zellen einschließlich der Mitosephasen in den lockeren Randgebieten der Ausstriche nach folgenden morphologisch unterscheidbaren Zellklassen differenziert:

Die Erythropoese wird unterteilt in (7):

Proerythroblasten,
basophile Erythroblasten,
polychromatische Erythroblasten,
oxyphile Erythroblasten,
reife Erythroblasten.

Die Granulopoese in (5):

Myeloblasten,

Promyelozyten,

neutrophile Myelozyten,

eosinophile Myelozyten,

basophile Myelozyten,

Promonozyten,

Metamyelozyten,

neutrophile stabkernige Granulozyten,

neutrophile segmentkernige Granulozyten,

eosinophile segmentkernige Granulozyten,

basophile segmentkernige Granulozyten,

Monozyten.

Mit Ausnahme der reifen Erythroblasten werden in der Erythropoese sämtliche Zellklassen als teilungsfähig angesehen.

In der Granulopoese werden als teilungsfähig eingestuft: Myeloblasten, Promyelozyten, Myelozyten, Metamyelozyten und die Promonozyten.

Als weitere Elemente aus dem reticulohistiozytären System (RHS) unterscheiden wir:

Die Plasmazelle: Der exzentrisch liegende Kern

ist meist rund mit grobtropfiger Chromatinstruktur. Das Cytoplasma ist charakteristisch kornblumenblau mit unterschiedlicher Anzahl und Größe von Vakuolen.

Die große Reticulumzelle: Der blaßrote runde oder ovale Kern besitzt feinfädige lockere Chromatinstruktur und Nucleolen. Die weite Cytoplasmagrenze des schwach acidophilen Cytoplasmas ist meist nicht erkennbar.

Die phagozytierende Reticulumzelle: Sie gleicht der großen Reticulumzelle, mit dem Unterschied intraplasmatischer Einlagerungen von phagozytiertem Material.

Die kleine Reticulumzelle: Der runde, selten ovale Kern besitzt sehr dichte grobschollige Chromatinstruktur, in der Größe ähnelt er den Lymphozyten. Die Farbe des Chromatins ist intensiv rot. Das wenige Cytoplasma ist, wenn vorhanden, von zart blauer Farbe.

Bei der Differenzierung der einzelnen Zellformen

werden auch deren verschiedene Mitosephasen beurteilt, die sich nach Boll (4,9) in 6 Phasen unterteilen lassen.

1. Prophase : Die Kernmembran ist aufgelöst. Die Nuclei sind nicht mehr vorhanden. Die aufgelockerten Chromosomen sind noch zu einem festen Spirem angeordnet.
2. Frühe Metaphase : Lockeres Spirem. Die Chromosomen sind über die ganze Zelle verteilt.
3. Späte Metaphase : Die Chromosomen verdoppeln sich und sind in einer Ebene, der Äquatorialplatte oder dem Monaster angeordnet.
4. Anaphase : Die geteilten Chromosomen ordnen sich je zur Hälfte an den entgegengesetzten Polen der Kernspindel.

5. Telophase : Die Chromosomen bilden ein lockeres Dispirem. Das Zellplasma ist mehr oder weniger eingeschnürt.
6. Rekonstruktionsphase: In beiden Zellen liegen die Chromosomen in festem Spirem. Die Kernmembran ist noch nicht ausgebildet. Teilweise besteht zwischen den Tochterzellen noch eine Plasmabrücke.

Aus den Differentialzählungen wird der prozentuale Anteil der einzelnen Zellklassen graphisch in Reifungskurven, getrennt für Erythropoese und Granulopoese, dargestellt.

Das Verhältnis von Granulopoese zu Erythropoese wird im G/E - Index ermittelt.

Die Mitoseindices, getrennt für Erythropoese und Granulopoese, geben das Verhältnis der Mitosen auf 1000 teilungsfähige Zellen, in Promille ausgedrückt, wieder.

Die karyologischen Kurven vermitteln uns in getrennten Schaubildern für Erythropoese und Granulopoese die prozentuale Verteilung der Mitosephasen.

ERGEBNISSE

1. Untersuchungsgut
2. Zellmorphologie
3. Reifungskurven
4. a. Mitose-Indices
 b. Karyologische Kurven
 c. Signifikanzberechnung der Mitosen
5. G/E -Indices

Knochenmarkproben wurden von folgenden Patienten zur Untersuchung verwendet:

Patient : K.G.
Einweisung : 6.8.69
Diagnose : Zustand nach Operation einer perforierten Appendix mit Unterbauchperitonitis. Es besteht eine erhebliche Leukozytose und erhöhte Blutsenkung bei primär chronischem Gelenkrheumatismus.

Knochenmarkdiagnose: Es handelt sich um einen entzündlichen Knochenmarkbefund. Kein Anhalt für eine Paraproteinose oder andere Erkrankungen.

Therapie bis zur Sternalpunktion: 13.10.69
Panflavin^R 3 x 2 Drg/die
Omniflora^R 3 x 1 Tbl/die
Mendural C^R 1 Kps/die

Blutbild : 6.10.69
Erythrozyten 3,35 Mill/mm³
Hb 9,9 g%
Leukozyten 17 300/mm³
Stabkernige 10 %
Segmentkernige 72 %
Lymphozyten 16 %
Monozyten 2 %

Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit:
106/135 mm/60 min / mm/120 min

Patient : F.I.

Einweisung : 29.7.69

Diagnose : Feucht dekompensierte, absolute
Tachyarrhythmie. Eisenmangelanämie.

Knochenmarkdiagnose: Normale Granulopoese, angeregte
linksverschobene Erythropoese. Der
Befund entspricht einer Eisenmangel-
anämie.

Therapie bis zur Sternalpunktion: 8.8.69

Valium ^R	10 mg/die
Novalgin ^R	1 Tbl
Lanicor ^R	2 x 0,25 mg/die
Cordalin ^R	2 ml
Vibramycin ^R	2 x 100 mg/die
Kaliner ^R Brausetbl.	1 Tbl/die
Lasix ^R	1 Tbl/die
Resoferix ^R	3 x 1 Drg/die
Mixt.Pepsini	3 x 1 Bzl/die

Blutbild : 30.7.69

Erythrozyten	3,46 Mill/mm ³
Hb	9,9 g%
Hb _E	28,3 %
Leukozyten	12 600/mm ³
Stabkernige	8 %
Segmentkernige	84 %
Lymphozyten	6 %
Monozyten	2 %

Eisenspiegel : 39,8 %

Patient : J.E.
Einweisung : 21.10.69
Diagnose : Lebercirrhose
Magenneoplasma

Knochenmarkdiagnose: Normale Granulopoese. Erythropoese vermehrt, linksverschoben. Sideroblasten und Siderocyten vorhanden. Sideroachrestische Anämie.

Therapie bis zur Sternalpunktion: 3.11.69
Valium^R 5 mg
Lanicor^R 3 x 0,25 mg/die
Atropin.sulf. 3 x 0,25 mg/die
Gallendiät und Eiweißzulage mit
3 x 1 EBl. Mixt.Pepsini/die

Blutbild : 22.10.69
Erythrozyten 3,13 Mill/mm³
Hb 10,3 g%
Hb_E 32,7 %
Leukozyten 8 800/mm³
Eosinophile 2 %
Stabkernige 12 %
Segmentkernige 66 %
Lymphozyten 11 %
Monozyten 4 %
atyp. mononucleäre Zellen 5 %
Reticulozyten 33 %
Thrombozyten 162 000/mm³

Patient : R.M.
Einweisung : 20.11.69
Diagnose : Dünndarmcarcinom

Knochenmarkdiagnose: Normale, nicht verschobene
Granulopoese. Erythropoese vermehrt,
linksverschoben. Angeregte Erythro-
poese wie bei Eisenmangel oder
chronischer Blutung.

Therapie bis zur Sternalpunktion: 25.11.69
Distraneurin^R 2 Tbl/die
Lanicor^R 0,50 mg/die
Vibramycin^R 1 Kps/die

Blutbild : 22.11.69
Erythrozyten 3,70 Mill/mm³
Hb 6,0 g%
Hb_E 15,7 %
Leukozyten 12 000/mm³
Stabkernige 3 %
Segmentkernige 80 %
Lymphozyten 9 %
Monozyten 7 %
atyp. mononucleäre Zellen 1 %

Patient : D.G.

Einweisung : 1.9.69

Diagnose : chronische Hepatitis

Knochenmarkdiagnose: Normale, nicht verschobene Granulopoese. Erythropoese etwas vermehrt, nicht verschoben. Vermehrung der Reticulum- und Plasmazellen sowie der Megakaryozyten spricht für sekundäre Tumorzeichen oder Infekt.

Therapie bis zur Sternalpunktion: 8.9.69

1 Eßl. magn.sulfat/die

Blutbild : 2.9.69

Erythrozyten	2,48 Mill/mm ³
Hb	9,1 g%
Hb _F	36,6 %
Leukozyten	15 000/mm ³
Stabkernige	6 %
Segmentkernige	84 %
Lymphozyten	8 %
Monozyten	2 %
Reticulozyten	86 ‰
Thrombozyten	566 000/mm ³

2. Zellmorphologie

In den Originalausstrichen wurden keine morphologischen Veränderungen der Knochenmarkzellen beobachtet. Unterschiedliche morphologische Veränderungen konnten in den Zusatzkulturen nur in geringem Maße erkannt werden. Vereinzelt wurden Zellen mit ausgeprägter Karyorhexis ("Gänseblümchenform") in der Erythropoese beobachtet. Weiterhin ließen sich Kernabsprengungen, Atypien der Kernform, verwaschene Kernstrukturen und Auflösung der Kernmembran erkennen. In geringem Maße traten Megaloblasten, riesenstabkernige und übersegmentierte Granulozyten auf. Im Cytoplasma konnte man unabhängig der Dosierung ab und zu vermehrte Plasmavakuolen beobachten, die sich aber hauptsächlich auf die Zellen der weißen Reihe beschränkten.

3. Reifungskurven (Abb. 1 - 18)

Aus den Knochenmarkkulturen von 5 Patienten wurden insgesamt 85 000 Zellen differenziert. Von 4 Patienten wurden jeweils 2 Kulturen mit verschiedenen Zusätzen angelegt und differenziert. Die Ausstriche des Patienten R.M. konnten auf Grund einer zu starken Agglutination der Zellen nach 72 Stunden Kultur nicht mehr differenziert werden. In der graphischen Darstellung ist der prozentuale Anteil der einzelnen Zellklassen additiv als Funktion der Zeit aufgetragen (Abb. 1 - 18).

Im Schaubild wurden folgende Abkürzungen verwendet.

Erythropoese:

- PE - Proerythroblasten
- bE - basophile Erythroblasten
- pE - polychromatische Erythroblasten
- oE - oxyphile Erythroblasten
- rE - reife Erythroblasten

Granulopoese:

- Mb - Myeloblasten
- Pm - Promyelozyten

My	-	neutrophile Myelozyten
Eo	-	eosinophile Myelozyten
MM	-	Metamyelozyten
Stab	-	neutrophile stabkernige Granulozyten
Seg	-	neutrophile segmentkernige Granulozyten
Eos	-	eosinophile segmentkernige Granulozyten
Mo	-	Monozyten
r MI	-	roter Mitoseindex
w MI	-	weißer Mitoseindex
G/E-I	-	Verhältnis der Granulopoese zur Erythropoese

Folgende Kennzeichen gelten:

—————	Kontrollkulturen
-----	Zusatzkulturen mit Daunomycin

Zusatzkulturen 0,1 δ /ml Daunomycin von 5 Patienten
Zusatzkulturen 0,5 δ /ml Daunomycin von 3 Patienten
Zusatzkulturen 1,0 δ /ml Daunomycin von 1 Patienten

Differentialzählung der Knochenmarkzellen

Fall I R.M. (Abb. 1 - 4) Blutungsanaemie

a. Erythropoese

(Abb. 1) Mit 0,1 δ /ml Daunomycin läßt sich aus der graphischen Darstellung der Reifungskurven im Vergleich der Kontrollkulturen zu den Zusatzkulturen eine geringe Verzögerung der Zellausreifung feststellen.

(Abb. 2) Die höhere Konzentration von 0,5 δ /ml Daunomycin zeigt uns wiederum eine geringe Verzögerung der Zellausreifung.

b. Granulopoese

(Abb. 3) Mit 0,1 δ /ml Daunomycin finden wir nach 24 Stunden Kultur eine geringfügig beschleunigte Zellausreifung der Myeloblasten und Promyelozyten, die nach 48 Stunden aber in eine Verzögerung der Zellausreifung übergegangen ist.

(Abb. 4) Unter 0,5 δ /ml Daunomycin trat nach 24 Stunden wiederum eine Linksverschiebung mit Verminderung der Promyelozyten auf. Nach 48 Stunden verzeichneten wir eine geringe Verzögerung der Zellausreifung mit relativer Verminderung der segmentkernigen Granulozyten.

Fall II K.G. (Abb. 5 - 8) Zustand nach
Peritonitis

a. Erythropoese

(Abb. 5) Mit 0,1 δ /ml Daunomycin finden wir bei
24 und 48 Stunden eine beschleunigte
Zellausreifung. Die 72 Stunden Werte ent-
sprechen ungefähr den Kontrollwerten.

(Abb. 6) Die höhere Konzentration von 0,5 δ /ml
Daunomycin lieferte beinahe dieselben
Ergebnisse.

b. Granulopoese

(Abb. 7) Mit 0,1 δ /ml Daunomycin wird nach 24
Stunden eine relative Verminderung der
Promyelozyten herbeigeführt. Nach 48 und
72 Stunden werden die Kontrollwerte
nahezu erreicht.

(Abb. 8) Die höhere Konzentration von 0,5 δ /ml
Daunomycin ergibt ungefähr dasselbe
Ergebnis.

Fall III J.E. (Abb. 9 - 12) Sideroachresie bei
Lebercirrhose und Magen-Carcinom

a. Erythropoese

(Abb. 9) Der Zusatz von 0,1 δ /ml Daunomycin ergibt nach 24 Stunden Kultur eine beschleunigte Ausreifung der basophilen Erythroblasten. Nach dem 2. und 3. Kulturtag tritt eine leichte Verzögerung der Ausreifung aller Erythroblasten auf.

(Abb. 10) Mit 0,5 δ /ml Daunomycin wurde nahezu dasselbe Ergebnis erzielt.

b. Granulopoese

(Abb. 11) Die Zusatzkultur mit 0,1 δ /ml Daunomycin bringt bei 24 Stunden eine Verzögerung der Ausreifung von Metamyelozyten und stabkernigen Granulozyten. Nach 48 Stunden zeigt sich nur eine geringe Abweichung gegenüber den Kontrollwerten.

(Abb. 12) Mit 0,5 δ /ml Daunomycin zeigt sich ebenfalls eine Verzögerung in der Ausreifung von stabkernigen und segmentkernigen Granulozyten. Nach 48 Stunden werden die Kontrollwerte wieder erreicht.

Fall IV D.G. (Abb. 13 - 14) Anämie bei
chronischer Hepatitis

a. Erythropoese

(Abb. 13) Mit 0,1 δ /ml Daunomycin zeigt sich nach 48 Stunden eine gering beschleunigte Ausreifung der basophilen Erythroblasten. Nach 3 Kulturtagen finden wir eine verzögerte Ausreifung der basophilen Erythroblasten.

b. Granulopoese

(Abb. 14) In der Granulopoese beobachtet man nach einer Bebrütungsdauer von 24 und 48 Stunden eine prozentuale Abnahme der Promyelozyten. Nach dem 3. Kulturtage wurde der Kontrollwert aber wieder erreicht.

Fall V F.I. (Abb. 15 - 18) Eisenmangel-Anaemie

a. Erythropoese

(Abb. 15) Mit 0,1 δ /ml Daunomycin zeigt sich nach 24, 48 und 72 Stunden Kultur eine ausgeprägte prozentuale Verminderung der basophilen Erythroblasten.

(Abb. 16) Ein Vergleich der Kontrollkulturen mit den Zusatzkulturen der 10-fach höheren Konzentration von 1,0 δ /ml Daunomycin ergibt dieselben Veränderungen.

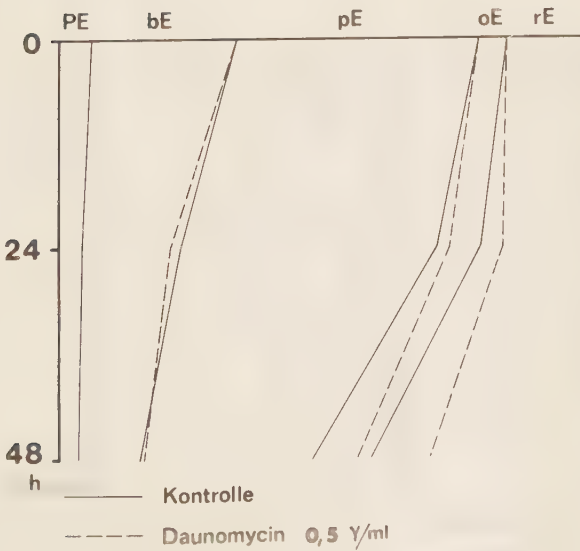
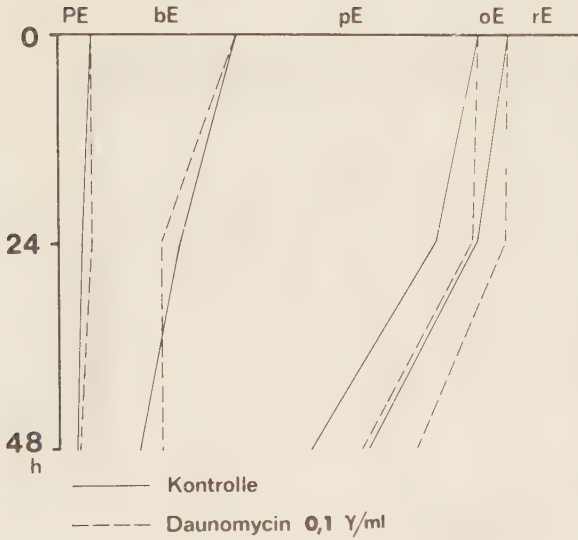
b. Granulopoese

(Abb. 17) Mit 0,1 δ /ml Daunomycin erkennt man in der Zusatzkultur gegenüber der Kontrollkultur nach 48 Stunden eine gering beschleunigte Ausreifung der Promyelozyten und Myelozyten, die auch am 3. Kulturtag anhält.

(Abb. 18) 1,0 δ /ml Daunomycin bewirkt schon nach 24 Stunden eine Linksverschiebung der Promyelozyten, die ebenfalls nach dem 3. Kulturtag zu Tage tritt.

Erythropoese

Patient: R.M.



Granulopoese

Patient : R.M.

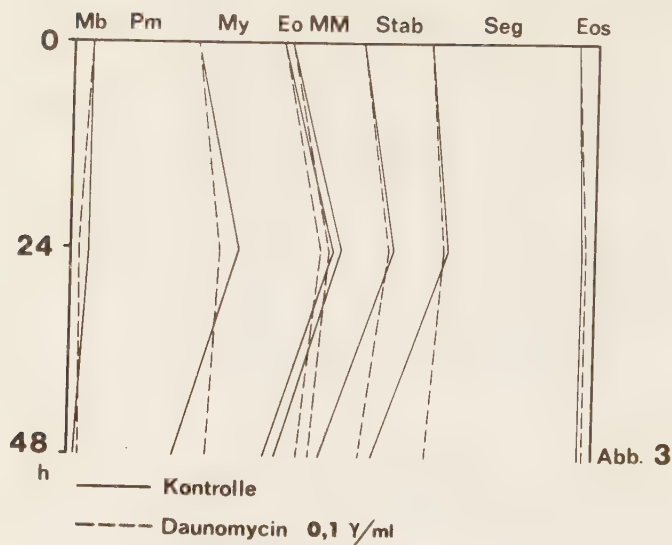


Abb. 3

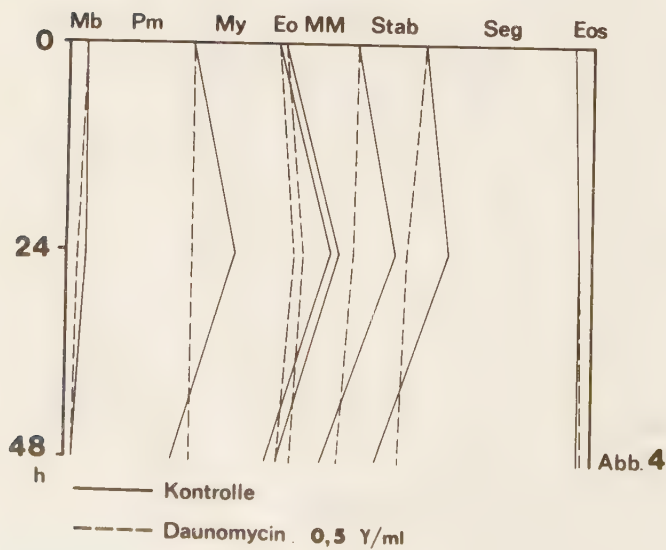


Abb. 4

Erythropoese

Patient: K.G.

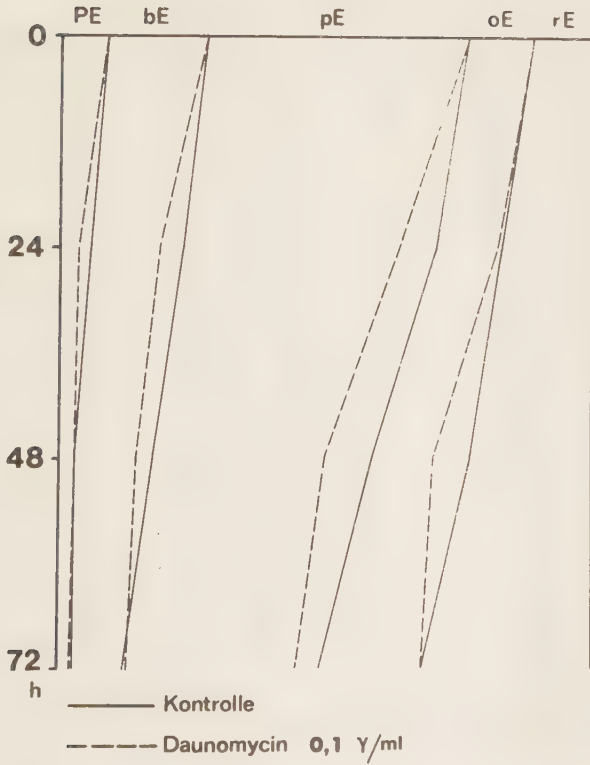


Abb. 5

Erythropoese

Patient : K.G.

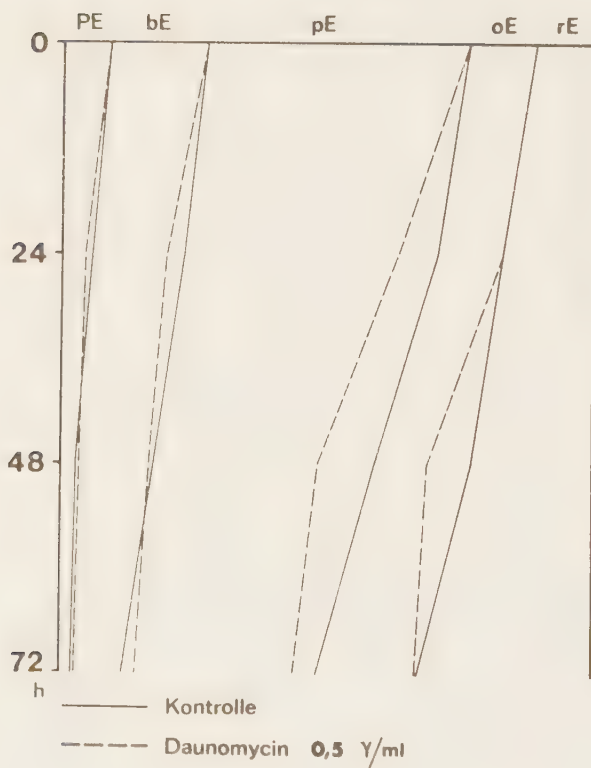


Abb. 6

Granulopoese

Patient : K.G.

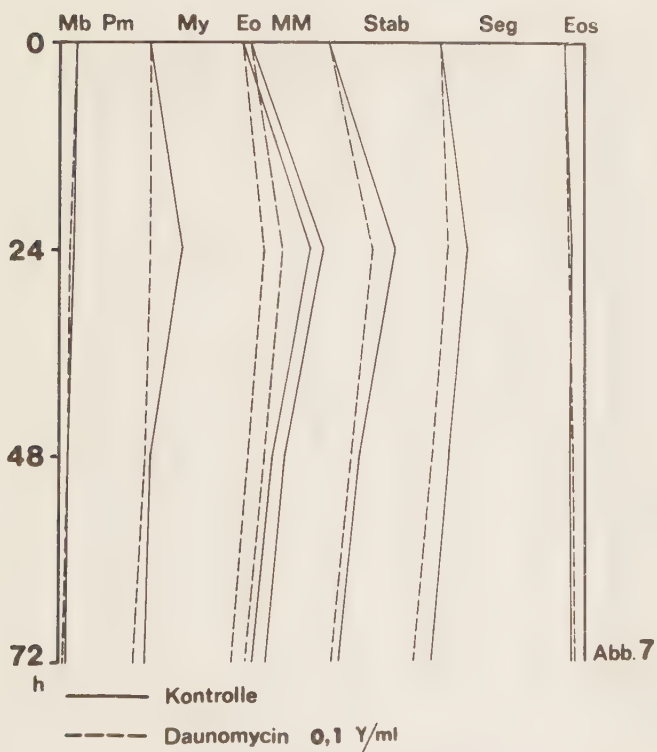
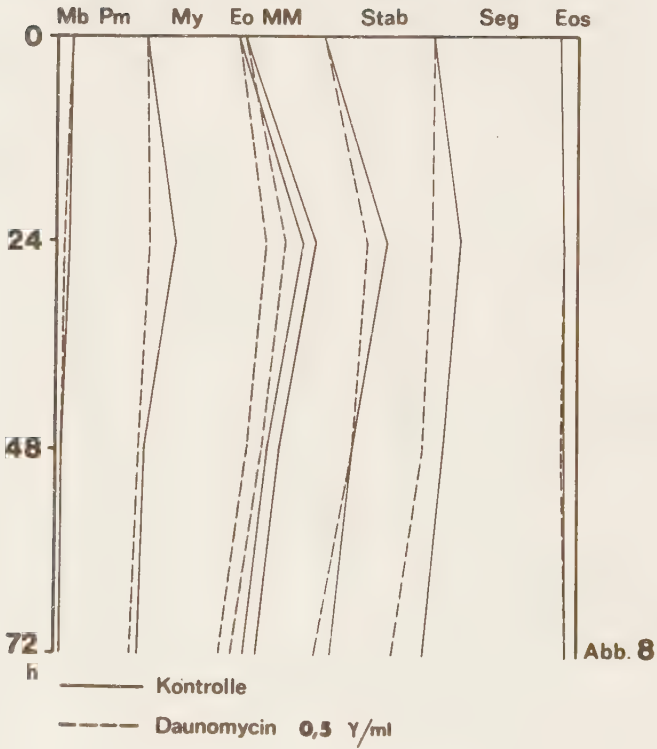


Abb. 7

Granulopoese

Patient : K.G.



Erythropoese

Patient: J. E.

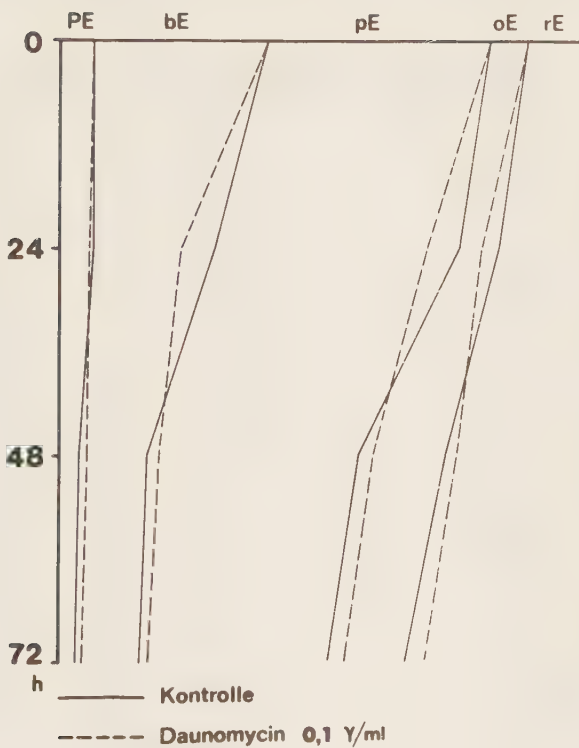


Abb. 9

Erythropoese

Patient : J. E.

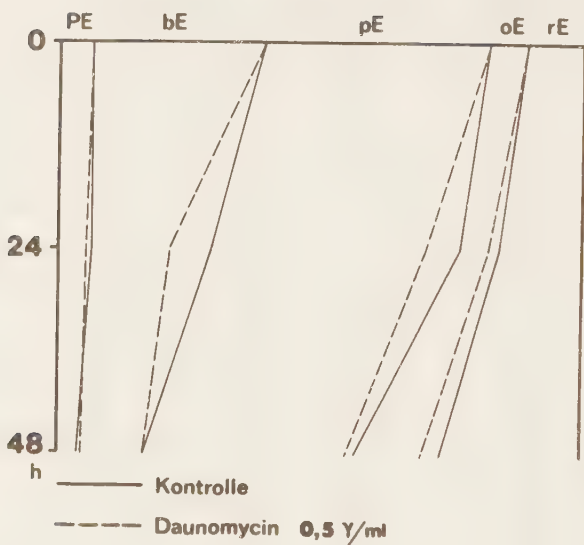


Abb. 10

Granulopoese

Patient : J. E.

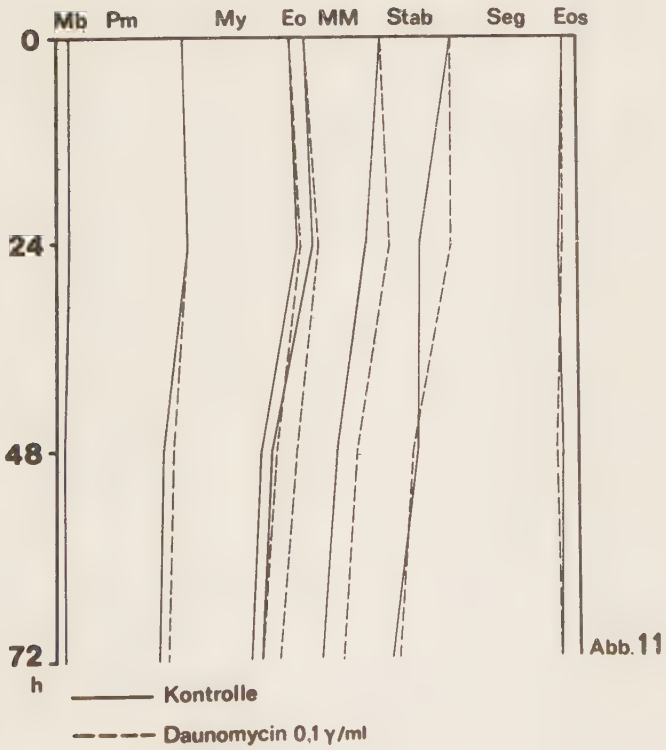


Abb. 11

Erythropoese

Patient : D.G.

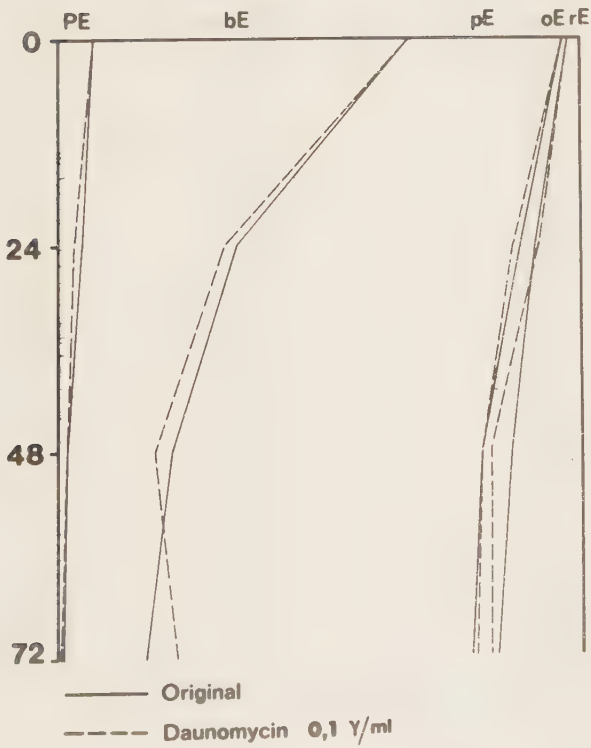


Abb. 13

Granulopoese

Patient : D. G.

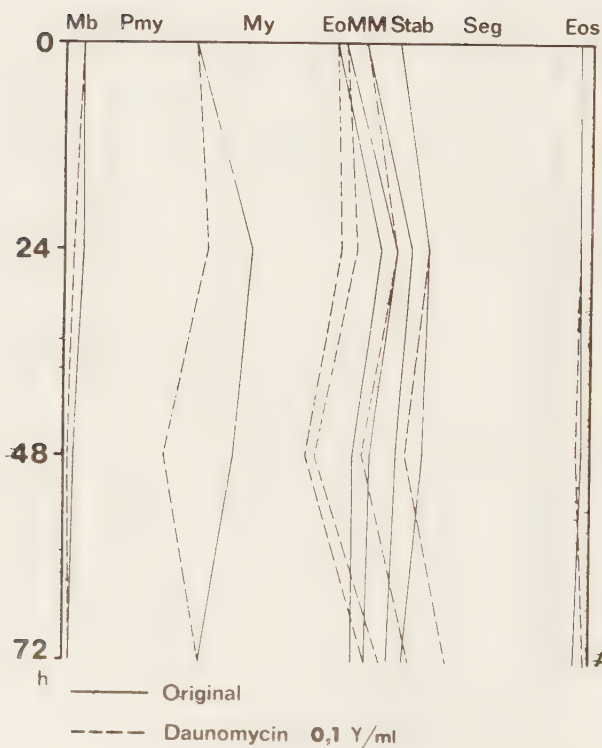


Abb. 14

Erythropoese

Patient : F. I.

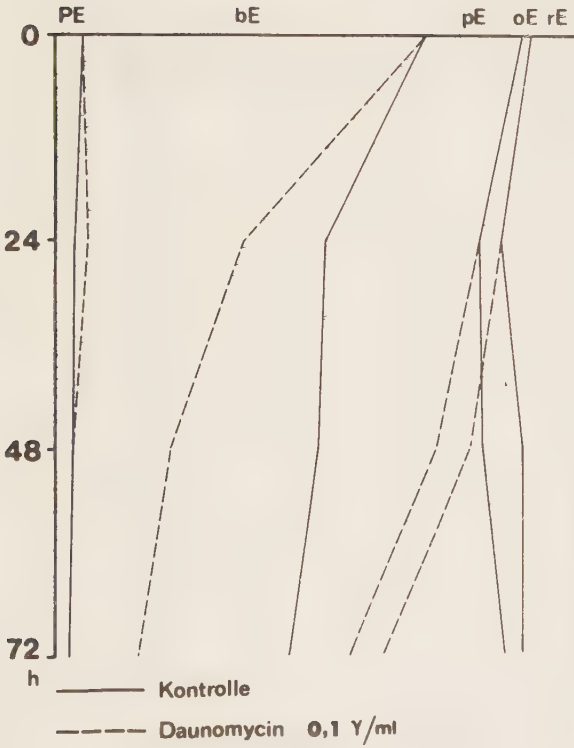


Abb. 15

Erythropoese

Patient: F. I.

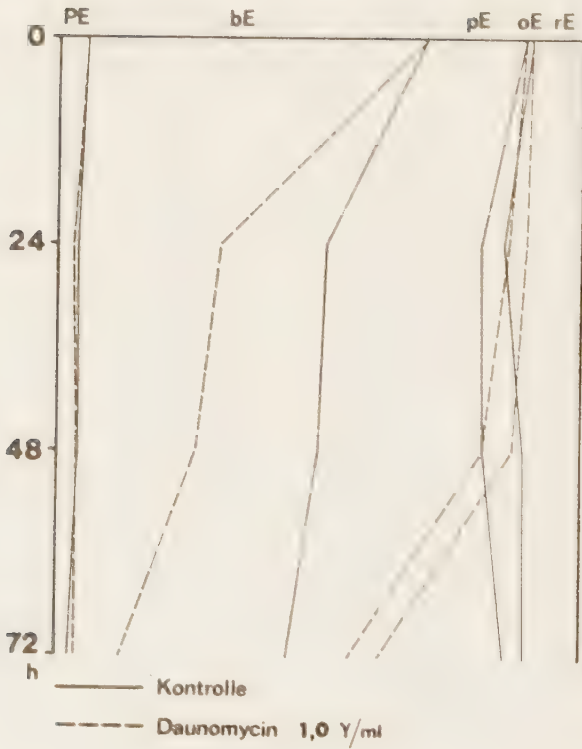


Abb. 16

Granulopoese

Patient : F. I.

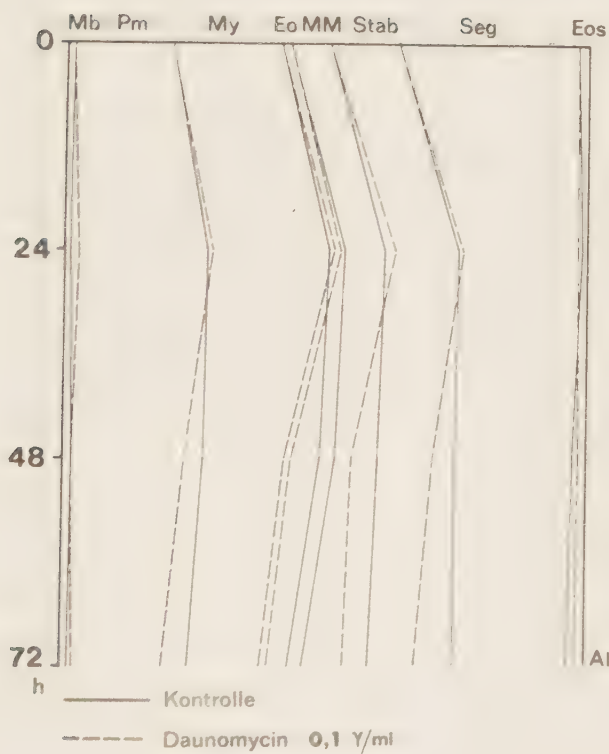


Abb. 17

Granulopoese

Patient : F. I.

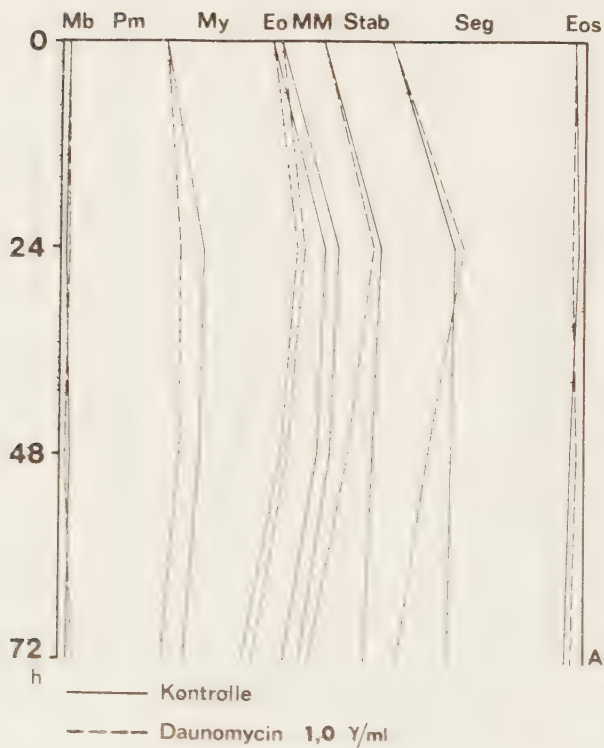


Abb. 18

4. a. Mitose - Indices (Tabelle 1,2)

Die Mitoseindices geben uns einen Hinweis auf die Regenerationsaktivität der Zellen. In der Erythropoese kommt es unter Daunomycineinfluß aller drei verschiedenen Konzentrationen zu einem dosisabhängigen Abfall der Mitoseindices.

In der Granulopoese zeigt sich in den Kontrollkulturen nach 24 Stunden Bebrütungsdauer der übliche Anstieg der Mitoseindices gegenüber dem Originalausstrich, der nach 48 Stunden wieder abfällt. In den Zusatzkulturen bewirkten die drei verschiedenen Daunomycinzusätze eine dosisabhängige Erniedrigung der Mitoseindices.

Tabelle 1

Mitose - Indices der Erythropoese (in Promille)

Patient	Ori- ginal	Kontrolle				0,1 δ /ml Daunomycin		
		0 Std.	24 Std.	48 Std.	72 Std.	24 Std.	48 Std.	72 Std.
R.M.	15,2	15,1	10,9	-		10,9	5,6	-
K.G.	12,3	15,1	2,6	0		5,9	2,2	0
J.E.	13,7	14,0	10,4	8,1		15,1	9,8	7,7
D.G.	14,4	6,6	0	0		6,1	0	
F.I.	35,8	14,1	3,7	2,1		4,2		2,9
Arith.								
Mittel	18,2	12,9	5,5	2,5		8,4	3,5	2,6

0,5 δ /ml
Daunomycin

						24 Std.	48 Std.	72 Std.
R.M.	15,2	15,1	10,9	-		12,6	7,7	-
K.G.	12,3	15,1	2,6	0		2,2	2,6	0
J.E.	13,7	14,0	10,4	8,1		14,1	10,4	0
Arith.								
Mittel	13,7	14,7	7,9	4,0		9,6	6,9	0

1,0 δ /ml
Daunomycin

						24 Std.	48 Std.	72 Std.
F.I.	35,8	14,1	3,7	2,1		1,5	0	0

Tabelle 2

Mitose - Indices der Granulopoese

(in Promille)

Patient	Ori- ginal	Kontrolle				0,1 δ /ml Daunomycin		
		0 Std.	24 Std.	48 Std.	72 Std.	24 Std.	48 Std.	72 Std.
R.M.	12,0	14,7	9,8	-		7,8	4,0	-
K.G.	11,0	13,5	10,3	6,8		10,7	8,8	4,6
J.E.	10,8	11,4	8,4	7,7		11,3	9,2	8,5
D.G.	13,5	14,5	9,4	4,9		10,8	2,7	0
F.I.	13,1	8,2	6,5	6,3		7,1	2,6	0
Arith. Mittel	12,08	12,4	8,8	6,4		9,5	5,4	3,2

						0,5 δ /ml Daunomycin		
						24 Std.	48 Std.	72 Std.
R.M.	12,0	14,7	9,8	-		13,1	8,9	-
K.G.	11,0	13,5	10,3	6,8		8,9	5,1	1,5
J.E.	10,8	11,4	8,4	7,7		10,9	9,7	-
Arith. Mittel	11,2	13,2	9,5	7,2		10,9	7,9	1,5

						1,0 δ /ml Daunomycin		
						24 Std.	48 Std.	72 Std.
F.I.	13,1	8,2	6,5	6,3		2,8	2,9	3,3

4. b. Karyologische Kurven (Abb. 19,20, Tabelle 3)

Die karyologischen Kurven zeigen uns in der Erythropoese keine ausgeprägten Unterschiede. Eine dosisabhängige Verminderung der späten Metaphase ist zu erkennen. Rekonstruktionsphasen konnten in den Zusatzkulturen nicht mehr beobachtet werden.

Die karyologischen Kurven der Granulopoese lassen eine relative Vermehrung der frühen Metaphase unter Daunomycineinfluß erkennen. Auffällig ist auch hier eine dosisabhängige Verminderung der späten Metaphase, Anaphase und Telophase, während wiederum keine Rekonstruktionsphasen in den Zusatzkulturen gefunden wurden.

Tabelle 3

Verteilung der Mitosephasen von 395 gezählten Mitosen

	P	fM	sM	A	T	R	
Kr	35	23	18	3	2	3	84
Z ₁ r	13	9	6	2			30
Z ₂ r	10	5	3	1	1		20

						Summe	134

	P	fM	sM	A	T	R	
Kr %	41,6	27,3	21,4	3,5	2,3	3,5	
Z ₁ r %	40,3	30,0	20,0	6,6			
Z ₂ r %	50,0	25,0	15,0	5,0	5,0		

	P	fM	sM	A	T	R	
Kw	39	46	42	15	3	3	148
Z ₁ w	21	29	15	2	1		68
Z ₂ w	13	20	9	1			43

						Summe	259

	P	fM	sM	A	T	R	
Kw %	26,3	31,0	28,4	10,1	2,0	2,0	
Z ₁ w %	30,8	42,6	22,0	2,9	1,4		
Z ₂ w %	30,2	46,5	20,9	2,3			

Kr Kontrollkulturen der roten Reihe

Z₁r Zusatzkulturen der roten Reihe 0,1 δ /ml Daunomycin

Z₂r Zusatzkulturen der roten Reihe 0,5 δ /ml Daunomycin

Kw Kontrollkulturen der weißen Reihe

Z₁w Zusatzkulturen der weißen Reihe 0,1 δ /ml Daunomycin

Z₂w Zusatzkulturen der weißen Reihe 0,5 δ /ml Daunomycin

Mitosephasenverteilung

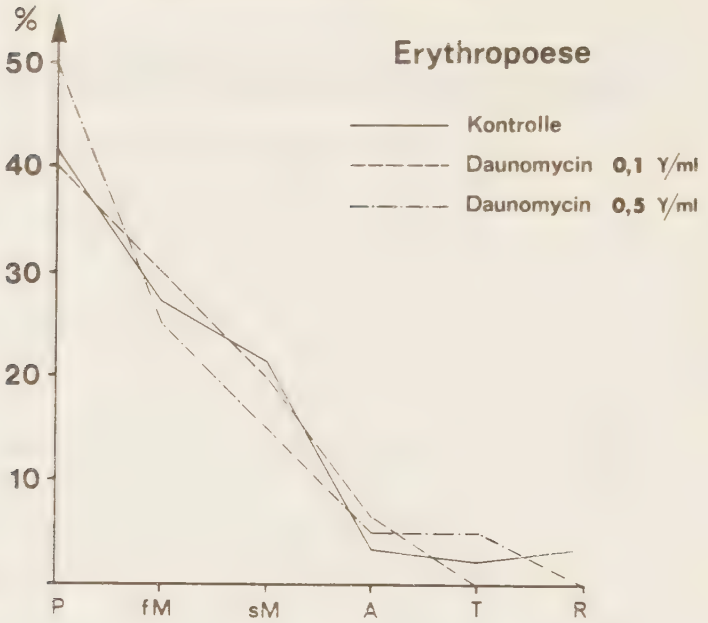


Abb. 19

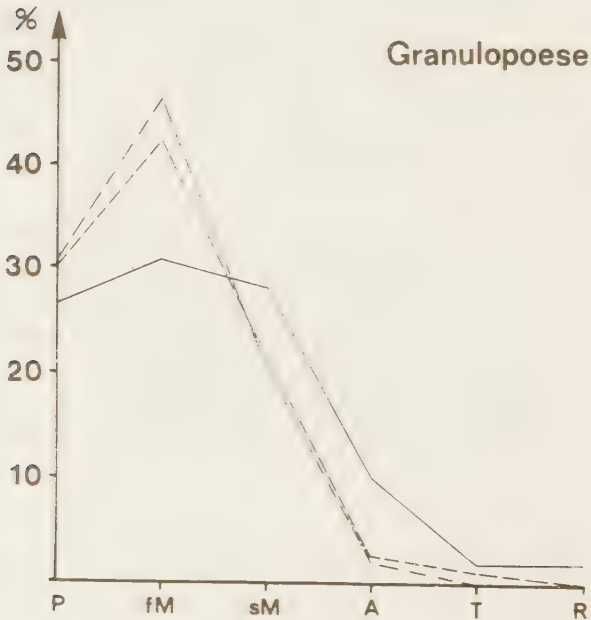


Abb. 20

4. c. Signifikanzberechnung der Mitosen

Signifikanzberechnung auf abweichende Mitosenverteilung für Kontroll- und Zusatzkulturen nach dem χ^2 - Test von Helmert PEARSON (Tabelle 4a, 4b, 4c).

Folgende Zeichen bedeuten:

- B_M : Beobachtungswert Mitosen
 B_N : Beobachtungswert "Nicht-Mitosen"
 E_M : Erwartungswert Mitosen
 E_N : Erwartungswert "Nicht-Mitosen"

Tabelle 4a Erythropoese und Granulopoese

0,1 δ /ml Daunomycin aller Fälle für 24, 48 und 72 Std.

	B_M	B_N	B_{M+N}	E_M	E_N
Kontrolle	141	16928	17069	120,709	16948,290
Zusätze	98	16629	16727	118,290	16608,709
	$\frac{(B_M - E_M)^2}{E_M}$		$\frac{(B_N - E_N)^2}{E_N}$	$\int \frac{(B - E)^2}{E}$	
Kontrolle	3,4107		0,0242	3,4349	
Zusätze	3,4805		0,0247	3,5052	

$$\chi^2 = 6,9401$$

bei 1 Freiheitsgrad $p = 0,0085$

Tabelle 4b Erythropoese und Granulopoese

0,5 δ /ml Daunomycin der Fälle I, II und III für 24, 48 und 72 Stunden

	B_M	B_N	B_{M+N}	E_M	E_N
Kon-					
trolle	82	8001	8083	72,855	8010,143
Zusätze	63	7941	8004	72,143	7931,856
	$\frac{(B_M - E_M)^2}{E_M}$		$\frac{(B_N - E_N)^2}{E_N}$		$\int \frac{(B - E)^2}{E}$
Kon-					
trolle	1,1476		0,0104		1,1580
Zusätze	1,1589		0,0105		1,1694
					$\chi^2 = 2,3274$

bei 1 Freiheitsgrad $p = 0,13$

Tabelle 4c Erythropoese und Granulopoese

1,0 δ /ml Daunomycin des Falles V für 24, 48 und 72 Std.

	B_M	B_N	B_{M+N}	E_M	E_N
Kon-					
trolle	26	3801	3827	17,057	3808,909
Zusätze	7	3568	3577	15,942	3560,090
	$\frac{(B_M - E_M)^2}{E_M}$		$\frac{(B_N - E_N)^2}{E_N}$		$\int \frac{(B - E)^2}{E}$
Kon-					
trolle	4,688		0,0164		4,704
Zusätze	5,016		0,0175		5,033
					$\chi^2 = 9,737$

bei 1 Freiheitsgrad $p = 0,002$

Bei einer Daunomycinkonzentration von 0,1 μ /ml (Tab. 4a) und 1,0 μ /ml (Tab. 4c) wurde eine signifikante Abnahme der Mitosenverteilung festgestellt. Die Abnahme der Mitosenverteilung unter 0,5 μ /ml Daunomycin (Tab. 4b) ist wegen der zu kleinen Zahl zufallsbedingt.

5. G/E - Indices (Tabelle 5)

Die G/E - Indices der Originalausstriche zeigen gewisse Abweichungen auf. Das arithmetische Mittel liegt aber in der Norm. Während der 3 Kulturtage zeigt sich eine Abnahme der G/E - Indices. Unter der Einwirkung verschiedener Konzentrationen von Daunomycin läßt sich keine deutliche Veränderung feststellen, außer bei 1,0 μ /ml erniedrigt.

Tabelle 5

G/E - Indices

Patient	Ori- ginal	Kontrolle				0,1 δ /ml Daunomycin		
		0 Std.	24 Std.	48 Std.	72 Std.	24 Std.	48 Std.	72 Std.
R.M.		2,5	2,3	2,0	-	3,4	2,6	-
K.G.		5,9	2,9	2,7	2,7	2,0	2,0	2,1
J.E.		2,8	2,7	2,6	2,3	2,8	2,5	2,3
D.G.		1,6	1,25	1,6	1,2	1,6	2,5	1,68
F.I.		3,5	2,8	2,3	2,6	2,4	2,5	2,4
Arith. Mittel		3,2	2,39	2,2	2,2	2,4	2,4	2,1

						0,5 δ /ml Daunomycin		
						24 Std.	48 Std.	72 Std.
R.M.		2,5	2,3	2,0	-	3,0	2,4	-
K.G.		5,9	2,9	2,7	2,7	2,4	2,5	2,3
J.E.		2,8	2,7	2,6	2,3	2,6	2,4	-
Arith. Mittel		3,7	2,6	2,4	2,5	2,6	2,4	2,3

						1,0 δ /ml Daunomycin		
						24 Std.	48 Std.	72 Std.
F.I.		3,5	2,8	2,3	2,6	1,6	1,8	2,0

DISKUSSION

An 5 Knochenmarkkulturen wird der direkte Einfluß von Daunomycin in verschiedenen Konzentrationen auf die nicht leukämische Hämatopoese untersucht. Entsprechende Untersuchungen sind aus der Literatur nicht bekannt.

Daunomycin wird vorwiegend zur Behandlung acuter Leukämie angewandt (12,22,23,33,39,40,41,42). In dieser Hinsicht stellt sich für uns die Frage, inwieweit die normale Hämatopoese unter Daunomycinbehandlung Veränderungen unterworfen wird. In unserer Untersuchungsreihe betrug die Daunomycinkonzentration 0,1 δ /ml, 0,5 δ /ml und 1,0 δ /ml. Diese Dosierungen wurden an die in der Literatur angegebene Dosierung von 1 mg/kg entsprechend angelehnt.

Parameter wie Reifungskurven und G/E - Indices geben uns Aufschluß über die Reifung, während uns Mitose-Indices und karyologische Kurven eine Beurteilung der Regeneration geben. Mit Hilfe aller Parameter wird die Proliferationsaktivität der Koagulumkulturen unter Daunomycinzusatz gegenüber den Kontrollkulturen verglichen. Auf diese Weise lassen sich kinetische und morphologische Veränderungen der

Knochenmarkzellen beurteilen.

Die Granulopoese ohne Daunomycinzusatz zeigt in der Reifungskurve folgende Charakteristika (4,5,6). Die Knochenmarkausstriche nach 24 Stunden Kontrollkultur weisen eine Vermehrung der teilungsfähigen Granuloblasten auf. Boll (5) führt diesen Effekt auf eine Stimulierung der Regeneration durch die Kulturbedingungen auf Grund einer wachstums- und mitoseanregenden Wirkung des Corrhormons auf die Koagulumkultur zurück. Diese Verschiebung wird durch die kurze Lebensdauer der segmentkernigen Granulozyten unterstrichen. Nach einer Bebrütungsdauer von 48 und 72 Stunden kommt es zu einer beschleunigten Zellausreifung, d.h. die Reifung überwiegt die Regeneration. Durch Fehlen der Ausschwemmung von reifen Granulozyten in der Kultur kommt es zu einer relativen Vermehrung der segmentkernigen Granulozyten.

Unter Daunomycinzusatz zeigt sich in den Reifungskurven eine Abnahme der teilungsfähigen Granuloblasten gegenüber den Kontrollkulturen.

Unter Einwirkung von Daunomycin auf die teilungsfähigen Zellen sowohl der Erythropoese als auch der

Granulopoese finden wir eine dosisabhängige Beeinträchtigung der Regeneration (Tab. 1, 2, 3, Abb. 19, 20).

Die Verminderung der teilungsfähigen Zellen unter Daunomycinzusatz in fast allen Fällen der Erythropoese und Granulopoese ist eine Bestätigung der Regenerationsbeeinträchtigung. Nach der Signifikanzberechnung (Tab. 4a,b,c) auf abweichende Mitosenverteilung für Kontroll- und Zusatzkulturen stellen wir eine signifikante Abnahme der Mitosen bei einer Daunomycinkonzentration von 0,1 μ /ml und 1,0 μ /ml fest. Die Abnahme der Mitosen unter 0,5 μ /ml Daunomycin ist wegen zu kleiner Zahl nur zufallsbedingt.

Nach unseren Beobachtungen konnten in der Erythropoese unter Daunomycineinfluß keine Rekonstruktionsphasen mehr festgestellt werden (Tab. 1, Abb. 19). Die Mitosephasenverteilung der Granulopoese (Tab. 2, Abb. 20) zeigt uns eine dosisabhängige Verminderung der späten Metaphase, Anaphase und Telophase. Rekonstruktionsphasen konnten auch nicht mehr gefunden werden, was auf eine Häufung unvollständiger sogenannter Endomitosen schließen läßt. Hiermit finden wir trotz der Abnahme der Mitosezahl eine Verzögerung

des Mitoseablaufs (t_m). Somit sinkt die Mitosehäufigkeit (m) noch stärker als der Mitoseindex (MI), da $m = \frac{MI}{t_m}$.

Nach Untersuchungen von Di Marco (15) an HeLa-Zellen soll Daunomycin in Konzentrationen von 0,1 bis 1,0 μ /ml bereits die Prophase der Mitose im Sinne einer Verminderung beeinträchtigen. Er beschreibt dabei schwere chromosomale Anomalien wie Brüche und Ringchromosomen. Bei einer Konzentration von 0,5 μ /ml Daunomycin konnte er durch Einbau von ^3H -Uridin in synchronisierten Rattenfibroblasten nachweisen, daß in größerem Ausmaß die nucleolare als die extranucleolare RNS-Synthese gehemmt wird.

Whang-Peng (45) beschreibt die Wirkung von Daunomycin auf normale menschliche Lymphozyten. Bei einer Konzentration von 0,3 μ /ml beobachtete er stärkere chromosomale Änderungen in der Metaphase. Auf Grund der Tatsache, daß nach unserer Versuchsanordnung in höherem Maße die Metaphase zunimmt, herrscht hier eine gewisse Übereinstimmung. Gleichfalls stimmt Whang-Peng mit Di Marco über die Form der chromosomalen Aberrationen überein. Unsere beobachteten morphologischen Anomalitäten wie megaloblastische Transformation

und eine erhöhte cytoplasmatische Vakuolisierung
finden wir auch durch Whang-Peng bestätigt.

ZUSAMMENFASSUNG

Da Daunomycin therapeutisch überwiegend die Proliferation leukämischer Zellen und das Wachstum von Tumoren hemmen soll, wurde in der dargestellten Untersuchung die Wirkung von Daunomycin auf normales Knochenmark in vitro untersucht.

In von Boll entwickelten speziellen Kulturen wurde das Knochenmark von 5 Patienten je mit einer Konzentration von 0,1 δ /ml Daunomycin, 3 Kulturen mit 0,5 δ /ml Daunomycin und 1 Kultur mit 1,0 δ /ml Daunomycin bebrütet.

Aus Differentialzählungen nach 0, 24, 48 und 72 Stunden Kultur wurden Reifungs- und karyologische Kurven sowie Mitose- und G/E -Indices in Beziehung zu den Kontrollkulturen gestellt.

Es zeigte sich eine signifikante Abnahme der Mitosen unter Daunomycineinfluß und eine besondere Verminderung der Endphasen, was auf eine Häufung unvollständiger sogenannter Endomitosen zurückgeführt wird. Entsprechend der fehlenden Regeneration nehmen die teilungsfähigen Vorstufen sowohl der Erythropoese als auch der Granulopoese ab.

LITERATURVERZEICHNIS

1. ARCAMONE, F., G. CASSINELLI, P. ORREZI, G. FRANCESCHI
und R. MONDELLI:
Daunomycin-II the structure and
stereochemistry of daunosamine.
J. Amer. Chem. Soc.
86, 5335-5336 (1964)
2. ASTALDI, G. e C. MAURI:
La valutazione dell'attività
proliferativa delle cellule
midollari.
Studio di un <test statmocinetico>
Haematologica
33, 331-364 (1949)
3. BERNARD, J., Cl. JACQUILLAT, M. BOIRON, Y. NAJEAN,
M. SELIGMANN, J. TANZER, M. WEIL,
P. LORTHOLARI
Essai de traitement des leucémies
aigues lymphoblastique et
myéloblastique par un antibiotique
nouveau:
La rubidomycine
Presse méd.
75, 951 (1967)
4. BOLL, I. : Die Proliferationskinetik der
normalen und leukämischen
Granulopoese.
Fol. haemat.
91, 172 (1969)
5. BOLL, I. : Granulocytopoese unter physiolo-
gischen und pathologischen
Bedingungen.
Springer - Verlag
Berlin - Heidelberg - New York
1966
6. BOLL, I. und G. FUCHS: Vereinfachtes Verfahren zur
kurzfristigen Kultivierung von
menschlichem Knochenmark in vitro.
Blut VII 257 (1961)
7. BOLL, I. und G. MERSCH: Morphologische Untersuchungen
zur Proliferationskinetik der
normalen und pathologischen
Erythropoese in vitro.
Blut 17 193 (1968)

8. BOLL, I. und G. MERSCH: Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Granulozytopoese in vitro.
Blut 19, 257-274 (1969)
9. BOLL, I. : Morphologische Studien zum Verhalten von Knochenmarkszellen in vitro - Granuloblastenmitosen Folia. haemat.
3, 78 (1959)
10. CALENDI, E., A. Di MARCO, M. REGGIANI, B. SCARPINATO und L. VALENTINI
Physicochemical interactions between daunomycin and nucleic acids.
Biochem. Biophys. Acta
103, 25-49 (1965)
11. COSTA, G. und G. ASTALDI: Effect of daunomycin on the proliferative activity of stem cells developed from human lymphocytes.
Tumori
50, 477-480 (1964)
12. DANO, K., N. I. NISSEN, J. PEDERSEN-BJERGAARD, T. THIEDE: Rubidomycin - Behandlung der akuten myeloischen Leukämie.
Nord - Med.
80 No 44, 1475-1482 (1968)
13. Di MARCO, A., M. SOLDATI, A. FIORETTI und T. DASDIA: The activity of Daunomycin, a new antitumor antibiotic, on normal and tumor cells growing in vitro.
Tumori
49, 235-252 (1963)
14. Di MARCO, A., M. SOLDATI, A. FIORETTI und T. DASDIA: Aktivität von Daunomycin, ein neues antitumor antibiotikum, an normalen und neoplastischen Zellen in vitro.
Cancer Chemother. Rep.
33, 39-47 (1964)
15. Di MARCO, A. : Mechanismus der Daunomycinwirkung
Acta Genet. med. (Roma)
17, 102-121 (1968)
16. Di MARCO, A., S. SILVESTRI, S. Di MARCO und T. DASDIA: Inhibiting effect of the new cytotoxic antibiotic, Daunomycin, on nucleic acids and mitotic activity of HeLa cells.
J. Cell Biol.
27, 545-550 (1965)

17. DI MARCO, A. : Daunomycin and related antibiotics
Symposium, Gottlieb and Shaw.
Eds., Heidelberg
Springer - Verlag (1967)
18. DI MARCO, A., M. GAETANI, L. DOSIGOTTI, M. SOLDATI and
O. BELLINI:
Daunomycin: a new antibiotik with
antitumor activity.
Tumori
49, 203-217 (1963)
19. DUBOST, M., P. GANTER, R. MORAL, L. NINET, S. PINNERT,
J. PREUD'HOMME und G.-H. WERNER:
Rubidomycin: a new antibiotic with
cytostatic properties.
Cancer Chemother. Repts.
41, 35-36 (1964)
20. FRANCESCHI, G., P. OREZZI, G. CASSINELLI, W. BARBIERI
and R. MONDELLI:
Daunomycin-I.
The structure of daunomycinone.
Ibid. pp. 5334-5335 (1964)
21. GREIN, A., C. SPALLA, A. DI MARCO und G. CANEVAZZI:
Descrizione e classificazione di
un attinomicete (streptomyces
peucetius sp. nova) produttore di
una sostanza ad attivita
antitumorale - La Daunomicina.
Giorn. Microbiol.
11, 109-118 (1963)
22. GERHARTZ, H. : Chemotherapie der akuten Leukämien
Deutsche Medizinische Wochenschrift
52, 2371-2375 (1967)
23. GERHARTZ, H. : Initialbehandlung der akuten
Leukämien.
Blut 8 101-104 (1969)
24. GOLDBERG, I. H. : Mode of action of antibiotics.
II. Drugs affecting nucleic acid
and protein synthesis.
Amer. J. Med.
39, 722-752 (1965)
25. COSTA, G. e G. ASTALDI: Effetto Della Daunomicina
Sull'Attività Proliferativa di
Cellule Staminali Ottenute in
Colture Da Sangue umano Normale.
Tumori Volume
50, No. 6 (1964)

26. GRUTTA, A. und F. MOLLICA: Über die Anwendung von Daunomycin in Kombination mit anderen Mitteln bei der Therapie der akuten Kinderleukämie. Haematologica 54, Fasc. 3 197-216 (1969)
27. KERSTEN, W. und H. KERSTEN: The binding of Daunomycin, Cererubin and Chromomycin A₃ to nucleic acids. Biochem. Zeitschrift. 341, 174-183 (1965)
28. KERSTEN, W., H. KERSTEN und W. SZYBALSKI: Physicochemical properties of complexes between desoxyribonucleic acid and antibiotics which affect ribonucleic acid syntheses. Biochemistry 5, 236-244 (1966)
29. KIM, J. H., A. S. GELBARD, B. DJORDJEVIC, S. H. KIM, A. C. PEREZ: Die Wirkung von Daunomycin auf den Nukleinsäurestoffwechsel und die Lebensfähigkeit von HeLa Zellen. Cancer Res. 28, No. 12, 2437-2442 (1968)
30. LIVINGSTON, R. B., S. K. CARTER: Daunomycin Chemother. Fact. Sheet, 1-20 (1970)
31. MAGLIULO, E., G. STASSANA und G. P. FIORI: Antimitotic activity of Daunomycin. Haematologica 49, 1091-1102 (1964)
32. MARCIMO, L., E. EORTUNA, A. FOSSATI-GUGLIELMONI: Wirksamkeit eines neuen zytostatischen Antibiotikums in der Behandlung maligner Tumoren des Kindesalters. Panminerva med. 10, No. 10 401-404 (1968)
33. MATHE, G., M. HAYAT, L. SCHWARZENBERG, J.-L. AMIEL, M. SCHNEIDER, A. CATTAN, J.-R. SCHLUMBERGER, Cl. JASMIN: Haute Frequence et Qualité des Remissions de la Leucémie aigue lymphoblastique chez l'Enfant. Arch. franc. Pédiat. 25, No. 2 181-188 (1968)

34. NAKAMURA, T. : Zytostatikum Daunomycin bremst
das Wachstum experimenteller
Tumorzellen.
Medical Tribune
World Wide Report
25; 2 (1969)
35. PITTILLO, R.F., D.E. HUNT: Biologische Wirkung von
Daunomycin in bakteriellen
Systemen.
Cancer Chemother. Rep.
52, No. 7 707-713 (1968)
36. PLEMPFEL, M. : Wirkungsmechanismus antibakteriell
und antimetabolisch wirksamer
Chemotherapeutica.
Internist.
8, 6 : 192 (1967)
37. SANFILIPPO, A. und R. MAZZOLENI: Attivita antifagica
dell'Antibiotico: Daunomycina
Giorn. Microbiol.
12, 83-92 (1964)
38. SACHTLEBEN, P., H. BINDER, D. KRÄMER, C. WEYRICH und
W. SCHWARTZ:
Zur Kombinationsbehandlung der
akuten Leukämie des Kindes mit
Dauno- Rubidomycin.
Deutsche Medizinische Wochenschrift
39, 1972-1978 (1969)
39. SHORE, N.A. : Daunomycin bei akuter Leukämie im
Kindesalter.
Proc. Amer. Ass. Cancer Res.
10, 80 (1969)
40. SOULIE, J. : Rubidomycin, ein neues Antibio-
tikum mit antitumoraler Wirkung.
Minerva Med.
59, No. 96 5236-5239 (1968)
41. TAN, C. und H. TASAKI: Daunomycin, remissions in
akute leukemia.
Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.
7, 70, 278 (1966)
42. TAN, C., H. TASAKI und A. Di MARCO: Clinical studies
of Daunomycin.
Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.
6, 64, 253 (1965)
43. THEOLOGIDES, A., J. W. YARBRO, B. J. KENNEDY:
Daunomycin Inhibition of DNA and
RNA Synthesis.
Cancer
76, No. 11-12 16-21 (1968)

44. WARD,D.C., E.REICH und I.H.GOLDBERG:
Base specificity in the interaction
of polynucleotides with antibiotic
drugs.
Science
149, 1259-1263 (1965)
45. WHANG-PENG,J., B.G.LEVENTHAL, J.W.ADAMSON, S.PERRY:
The Effect of Daunomycin on Human
Cells in Vivo and in Vitro.
Cancer
23, No. 1 113-121 (1969)
46. WÜST,G.P. : Zur Frage der praeklinischen Selektion
von Cytostatica im Rahmen der Behand-
lung menschlicher Tumoren.
Arzneimittelforsch.
19, 817 (1969)
47. YESAIR,D.W., D.SHUCK: The Metabolism of Daunomycin
by Sensitive and Resistant Tumors
Growing in Mice.
Proc.Am.Assoc.Cancer Res.
11, 87 (1970)
-

Studie im Rahmen der Assoziation Haematologie

EURATOM - GSF, Nr. 031-64-1 BIAD.

Die Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungs-
gemeinschaft unterstützt.

Frau Professor Dr. med. Irene Boll
möchte ich für die Überlassung des
Themas und ihre geduldige und
wertvolle Unterstützung herzlichst
danken.

Herrn Professor Dr. H. Belitz
danke ich für die Unterweisung und
Durchführung der Signifikanzberechnung.

Lebenslauf

Am 11. 1. 1940 wurde ich in Stuttgart geboren.

Nach dem Besuch der Grundschule in Neuffen Kreis
Nürtingen und Stuttgart - Bad Cannstatt Absolvierung
des Abiturs an der Gottlieb Daimler Oberschule in
Stuttgart - Bad Cannstatt.

1962 begann ich in Würzburg das Studium der
Zahnmedizin. 1967 immatrikulierte ich mich nach
bestandenem Physikum an der Freien Universität
Berlin und bestand hier 1969 die zahnärztliche
Prüfung.

Seit April 1970 bin ich als wissenschaftlicher
Assistent an der Zahn-, Mund- und Kieferklinik
der Freien Universität tätig.

